

Rapportage – executive summary – methodiekenprojecten Raad voor plantensoorten 2023 Financiën

Hieronder volgt het overzicht met de rapportages van de methodiekenprojecten die in 2023 met de financiële ondersteuning door de Raad voor plantensoorten zijn uitgevoerd.

Samenvattingen inhoudelijk:

Eindrapportages

2021-01	Methodieken vervolproject rasafstanden tulp 2020-2023
2022-02	Opzetten van resistentietoetsen ToBRFV in tomaat en paprika
2022-04	Merkerontwikkeling L-genen Tobamo resistentie in paprika
2022-10	Verbeteren DUS onderzoek hennep met DNA / Hennep database
2023-b1	Automatisering naamgeving foto's siergewassen
2023-b2	Construction of SNP database of common knowledge of cut rose
2023-a4	SNP discovery Sla

Tussenrapportages

2023-a1	Showcase Boon 2.0
2023-a6	Merkerontwikkeling Verticillium resistentie in tomaat-vervolg
2023-a7	Nieuwe methodes voor vegetatieve vermeerdering van gewone es

Eindrapportages

Hieronder vindt u de eindrapportages per project.

2021-1 Methodieken vervolproject rasafstanden Tulp 2020-2023

Stan van Oers (KAVB) en Katie Berbee (Naktuinbouw)

Doel

Inzicht krijgen in de geschiktheid van de kenmerken en kenmerkexpressies in de UPOV-richtlijn / CPVO-protocol bij het vaststellen van de onderscheidbaarheid. Op basis van dit onderzoek zal er worden gekeken naar een beleidslijn om de rasafstand in de praktijk beter hanteerbaar te maken.

Beschrijving van probleem

Er bestaat soms onrust bij tulpentelers over de onderscheidbaarheid van tulpenrassen, met name bij mutanten. De vraag is gerezen of de gekozen rasafstand wel voldoet in de praktijk. Hiervoor is in 2018 al het project Methodiekenonderzoek Rasafstanden Tulp uitgevoerd door K. Berbee-Pont (Naktuinbouw) & J. van Scheepen (KAVB), gefinancierd door de Raad voor plantensoorten. Eén van de adviezen hieruit was dat er verdiepend onderzoek nodig is om te bepalen welke kenmerken er geschikt zijn voor het bepalen van de onderscheidbaarheid.

Protocollen/richtlijnen voor het vaststellen van de onderscheidbaarheid

In het CPVO-protocol voor Tulipa wordt bij 7a) Distinctness verwezen naar artikel 7 van de Council Regulation No. 2100/94. Dit artikel zegt:

“Een ras wordt als onderscheidbaar aangemerkt indien het door de uitingvorm van de eigenschappen, die voortvloeit uit een bijzonder genotype of een combinatie van genotypen, duidelijk te onderscheiden is van elk ander ras...”

De UPOV schrijft in de General Introduction (TGP/1/3) dat een ras als duidelijk onderscheidbaar kan worden beschouwd als het verschil in kenmerken:

- (a) consistent, en
- (b) duidelijk is

In TGP/9/2 ‘Examining Distinctness’ van de UPOV wordt per kenmerksoort omschreven, welke criteria er in acht zouden moeten worden genomen bij een side-by-side comparison:

- *Kwalitatieve kenmerken (zgn. zwart/wit kenmerken)*

Voor dit soort kenmerken is een side-by-side vergelijking niet nodig. Gesteld wordt dat rassen met een andere expressie voor deze kenmerken bij voorbaat al onderscheidbaar zijn;

- *Pseudo-kwalitatieve kenmerken (met name vorm en kleurkenmerken)*
Indien een ras een andere expressie voor deze kenmerken heeft, hoeft dit niet te automatisch te betekenen dat er onderscheidbaarheid is. Het verschil tussen rassen moet visueel kunnen worden waargenomen.
- *Kwantitatieve kenmerken (kenmerken met een glijdende schaal)*
Bij elke vergelijking is een verschil tussen twee rassen acceptabel zodra dit visueel kan worden waargenomen.

Tevens geeft de UPOV in document TGP/9/2 aan dat, omdat visuele waarnemingen gebaseerd zijn op het oordeel van de expert, dat hiervoor training en ervaring noodzakelijk zijn. Het moet zeker zijn dat de waarnemingen accuraat, consistent en reproduceerbaar (tussen verschillende experts) zijn.

Uitvoering / waarnemingen

De focus ligt bij dit project op de kenmerken/expressies in de huidige richtlijn/protocol. Welke kenmerken zijn goed bruikbaar en welke zijn minder bruikbaar bij het bepalen van onderscheidbaarheid? Voldoen de huidige kenmerkexpressies nog bij het maken van de rasbeschrijving? Is er behoefte aan extra kenmerken en expressies? Mogelijk zal er een aanpassing van de UPOV-richtlijn / CPVO-protocol nodig zijn.

Ook is er gekeken naar de stabiliteit van verschillende kenmerkexpressies. Welke kunnen door externe factoren worden beïnvloed? Zijn er kenmerken die aan elkaar gekoppeld zijn? Gekeken zal worden naar de stabiliteit binnen een partij, stabiliteit gedurende de bloeiperiode, stabiliteit over jaren en stabiliteit tussen verschillende partijen.

Het project is uitgevoerd in 3 groeiseizoenen (2021, 2022 en 2023). Het eerste groeiseizoen is gebruikt als opstartjaar waarin de rassen zijn geselecteerd die in dit project gevolgd zijn en de te scoren kenmerken zijn vastgesteld. Tevens zijn, indien mogelijk, de eerste waarnemingen aan deze rassen gedaan. Hiervoor is gebruik gemaakt van de huidige UPOV-richtlijn / CPVO-protocol, vakliteratuur en ervaring. Er is niet naar het vegetatieve stadium van de rassen gekeken.

De referentiecollectie tulp bij de KAVB is gebruikt om de rassen te selecteren. Ook zijn er, vanuit de bij de KAVB gelegen proef ten behoeve van het scheidsgerecht, verschillende partijen van dezelfde rassen geselecteerd.

Er zijn per ras circa 20 bollen gebruikt van een goed bloeibare maat. De rassen hebben dezelfde bewaring ondergaan, zodat hun achtergrond gelijk is. Na elk groeiseizoen zijn de bollen geroid en op dezelfde manier behandeld en bewaard. Het tweede en derde groeiseizoen zijn gebruikt voor het doen van verdere waarnemingen. De waarnemingen zijn tijdens twee verschillende stadia van de bloei visueel uitgevoerd, te weten begin bloei en eind bloei.

In de onderstaande tabel is te zien welke rassen er geselecteerd zijn.

Type	aantal	Rassen
Parkiet	7	Parrot Prince, Smiling Parrot, Professor Parrot, Professor Röntgen, Dee Jay Parrot, Garden Fire en Garden Power
Gefranjerd	6	Huis ten Bosch, Drakensteyn, Lovers Town, Fabio, Burning Flame en Alexandrine
Dubbel	7	Yellow Margarita, Alison Bradley, Verona Red, Verona Love, Valeska, Reminder en Angel Cheeks
Bloemrand	5	Denmark, Replay, Spirit, Marketta en Striker
Enkel	6	Ollioules, Ad Rem, Salmon Dessert, Roeska, Kung Fu en Friendship in Red
Lelie	2	Thanksgiving Point en Sunrise

In de onderstaande tabel zijn de kenmerken en de daarbij behorende set met expressies te vinden.

Kenmerk	Expressieset
Stengel: anthocyaankleuring	1 ontbrekend of zeer zwak / 9 zeer sterk
Stengel: positie van anthocyaankleuring	omschrijving positie
Stengel: beharing	1 ontbrekend / 9 aanwezig
Bloem: mate van gevuldheid	1 zeer weinig / 9 zeer veel
Bloem: mate van franjering	1 zeer zwak / 9 zeer sterk
Bloem: mate van parkiet	1 zeer zwak / 9 zeer sterk
Bloem: breedte van bloemrand	1 zeer smal / 9 zeer breed
Bloem: mate van groenverkleuring buitenste tepalen	1 zeer zwak / 9 zeer sterk
Onderzijde bloem: zichtbaarheid (breedte) 'kont'	1 ontbrekend of zeer klein / 9 zeer groot
Onderzijde bloem: vorm 'kont'	1 afgerond / 2 met puntjes
Onderzijde bloem: hoofdkleur 'kont'	omschrijving kleur
Macule: vorm	1 esdoornblad (maple leaf) / 2 afgerond (rounded)
Macule: type rand	1 gefranjerd (fimbriate) / 2 airbrushed
Macule: kleur rand	omschrijving kleur
Macule: hoofdkleur	omschrijving kleur
Meeldraden: hoofdkleur basale deel	omschrijving kleur
Meeldraden: hoofdkleur distale deel	omschrijving kleur
Stamper: vorm	1 glad (smooth) / 2 gedraaid (twisted)

Resultaten

1) Stengel: anthocyaankleuring

De expressie van dit kenmerk kan veranderen tijdens de bloeiperiode. Dit was al bekend, maar is door dit meerjarenproject extra inzichtelijk geworden. In de meeste gevallen is de anthocyaankleuring aan het begin van de bloei sterker dan aan het einde van de bloei. Ook de positie van de anthocyaankleuring kan veranderen tijdens de bloei.

2) Stengel: beharing

Er is een duidelijk verschil tussen rassen in aanwezigheid van beharing. Ook is er een verschil in positie van de beharing. Dit blijkt een consistent kenmerk te zijn. De beharing is óf aanwezig óf afwezig en wordt niet beïnvloed door externe omstandigheden.

3) Bloem: mate van gevuldheid, mate van franjering en mate van parkiet

De drie bovengenoemde kenmerken zijn onmisbaar om rassen, binnen het type / de cultivargroep, te kunnen onderscheiden van elkaar. Tijdens ons onderzoek bleken deze kenmerken stabiel te zijn tijdens de bloei en door de jaren.

4) Bloem: breedte van de bloemrand

De breedte van de bloemrand is een stabiel kenmerk en blijkt niet beïnvloed te worden door de groeiomstandigheden. Dit kenmerk leent zich er goed voor om het verschil tussen rassen te kunnen aangeven.

5) Bloem: mate van groenverkleuring buitenste tepalen

Dit kenmerk is bruikbaar om rassen te onderscheiden. De grootste verschillen in mate van groenverkleuring zijn waar te nemen in de groepen parkiet en dubbelbloemig, maar ook in de andere groepen zijn er (kleinere) verschillen te zien. Naarmate de bloem rijper wordt kan de groenverkleuring minder worden, maar in de meeste gevallen blijft deze stabiel.

6) Bloem: onderzijde ('kont')

De vorm van de onderzijde ('kont') is lastig vast te stellen en draagt weinig bij aan de onderscheidbaarheid tussen rassen. Wel zit er een groot verschil tussen rassen in de zichtbaarheid (breedte) en kleur van de 'kont'. De breedte en de kleur blijkt in veruit de meeste rassen stabiel te zijn door de jaren en ook gedurende de bloei. De kleur van de 'kont' kan gedurende de bloei verbleken.

7) Bloem: macule

De vorm en het type rand van de macule zijn te moeilijk om vast te stellen en verre van stabiel. Ook dragen deze weinig bij aan de onderscheidbaarheid tussen rassen. De hoofdkleur en de kleur van de rand zijn wel goede kenmerken om rassen te onderscheiden. Deze twee kenmerken blijken stabiel. Gedurende de bloei kan de hoofdkleur iets verbleken.

8) Meeldraden: hoofdkleur

De hoofdkleur van het basale deel (onderste helft) en distale deel (bovenste helft) van de meeldraden zijn beide goede kenmerken om rassen te onderscheiden. Over de jaren heen blijken deze stabiel te zijn. Tijdens de bloei kan de kleur iets verbleken. Ook kan er gedurende de bloei een donkere zweem zichtbaar worden.

9) Stamper: vorm

In de meeste gevallen wordt het uiterlijk van dit kenmerk beïnvloed door de rijpheid van de bloem. Een jonge bloem heeft vaak een gladde stamper. Naar mate deze bloem ouder wordt gaat de stamper open en begint deze te draaien.

Conclusies

Een groot aantal van de bovengenoemde kenmerken zijn zeer bruikbaar bij het vast stellen van de onderscheidbaarheid tussen rassen.

Bruikbare kenmerken:

- Stengel anthocyaankleuring
- Stengel: beharing
- Mate van gevuldheid, mate van franjering en mate van parkiet
- Bloem: breedte van de bloemrand
- Bloem: mate van groenverkleuring buitenste tepalen
- Onderzijde bloem: zichtbaarheid (breedte) 'kont'
- Onderzijde bloem: hoofdkleur 'kont'
- Macule: kleur rand
- Macule: hoofdkleur
- Meeldraden: hoofdkleur

Een aantal van deze bruikbare kenmerken blijken te kunnen variëren in expressie tijdens de bloeiperiode. Voor deze kenmerken moeten duidelijke afspraken gemaakt worden op welk moment tijdens de bloei de waarneming gedaan moet worden.

Een klein aantal onderzochte kenmerken blijken niet bruikbaar te zijn. Dit komt doordat sommige van deze kenmerken moeilijk zijn waar te nemen, door een gebrek aan voldoende stabiliteit of omdat deze weinig toevoegen aan de onderscheidbaarheid tussen rassen.

Onbruikbare kenmerken

- Onderzijde bloem: vorm ('kont')
- Macule: vorm
- Macule: type rand
- Stamper: vorm

Discussie

Sommige kenmerken die kunnen variëren in expressie tijdens de bloei, zijn wel degelijk bruikbaar voor het DUS-onderzoek. De verschillen tussen rassen, die dezelfde achtergrond hebben, kunnen groot zijn. Voldoende groot om de rassen onderscheidbaar te noemen. Als twee rassen verschillen, maar niet dezelfde achtergrond hebben, dan moet de waarnemer zich er bewust van zijn dat een mogelijk verschil, juist hierdoor veroorzaakt kan zijn. Als het verschil op één van deze kenmerken het enige verschil is, dan is een heropplant altijd noodzakelijk. De verschillen in achtergrond worden hiermee uitgesloten en er kan een betrouwbare conclusie getrokken worden.

De expressie van de kenmerken 'mate van gevuldheid' en 'mate van parkiet' waren stabiel tijdens het onderzoek. Maar er is bekend dat bij kleine bolmaten de expressie soms minder duidelijk kan zijn. Bloemen van kleine bolmaten kunnen bijvoorbeeld minder dubbel zijn dan bloemen van grotere maten. Indien twee rassen alleen een verschil hebben op één van deze kenmerken, dan moet de waarnemer uitsluiten dat niet de bolmaat hiervoor verantwoordelijk is. Een heropplant met bollen van gelijke grootte kan dan eventueel noodzakelijk zijn.

Soms zijn er rassen met een hele bijzondere of zelfs extreme expressie van een bepaald kenmerk, waardoor het ras op basis van dat kenmerk wel onderscheidbaar is. Denk bijvoorbeeld aan een hele bijzondere vorm of kleur van de stamper, of van de bloem (bijv. de Coronet Groep). Deze kenmerken kunnen dan als additioneel kenmerk worden opgenomen in de rasbeschrijving.

Door het kiezen van zorgvuldig geselecteerde referentierassen kunnen waarnemingen geijkt worden. De expressies bij de kenmerken: mate van gevuldheid, mate van franjerig, mate van parkiet en breedte van bloemrand zijn stabiel en kunnen gerelateerd worden aan de voorbeeldrassen. Waarnemingen worden hierdoor accuraat, consistent en reproduceerbaar.

Bij het vaststellen van de kenmerken waarbij kleur een rol speelt is het gebruik van gestandaardiseerde RHS kleurenkaarten aan te bevelen. Met het menselijk oog zijn kleuren niet objectief te beoordelen en verschillen in interpretatie zijn onvermijdelijk. Door het gebruik van kleurenkaarten wordt dit beperkt.

Het gebruik van de levende referentiecollectie op de KAVB-proeftuin is onontbeerlijk voor gedegen DUS-onderzoek. Hiernaast kan een DNA-database de kwaliteit van het DUS onderzoek en de betrouwbaarheid van de uitslag op onderscheidbaarheid nog groter maken.

Wederom blijkt uit dit onderzoek dat een exacte richtlijn voor het bepalen van een minimale rasafstand bij tulpen niet haalbaar is. Sommige kenmerken kunnen worden beïnvloed door herkomst of bewaring van de bollen. Aan de hand van het protocol zal zo veel mogelijk rekening moeten worden gehouden met stabiele kenmerken die voldoende van elkaar verschillen in expressie. Bij kleine verschillen of verschillen op alleen kenmerken die beïnvloed kunnen worden door de bolachtergrond, zal eerder tot een vervolgonderzoek besloten moeten worden.

Aanbevelingen

1. Revisie van de UPOV-richtlijn waarbij in ieder geval de, in dit project, als bruikbaar beoordeelde kenmerken worden opgenomen;
2. Vaststellen uniform waarnemingsmoment;
3. Vaststellen en gebruiken van vaste set referentierassen / kalibratieboek;
4. Gebruik kleurenkaart bij kleurwaarnemingen;
5. Eerder besluiten tot een tweedejaars opplanting voor sterk gelijkende rassen om verschillen door herkomst uit te sluiten;
6. Mogelijkheden onderzoeken voor opbouw DNA-database tulp;
7. Inzicht krijgen in toepasbaarheid ziekte resistentie, toetsontwikkeling.

Financiële verantwoording

Het budget is niet volledig benut.

Strategische conclusie:

Dit project geeft inzicht in de invloed van de bolachtergrond op bepaalde kenmerken. Ook blijkt ook het belang van het waarnemingsmoment groot. Deze twee variabelen moeten meegenomen worden bij de bepaling van de onderscheidbaarheid. Bij twijfel hierover, is een her-opplant, onder dezelfde groeiomstandigheden, met bollen van dezelfde achtergrond, noodzakelijk. Alleen hierdoor kan er een juiste beslissing over onderscheidbaarheid worden genomen. Hiermee kunnen ook bij kleinere rasafstanden goede beslissingen over onderscheidbaarheid worden genomen.

2022-02 ToBRFV resistentietoetsen (TMT/PPS) +Aphis (MLN)

Operationele conclusies:

Project heeft een tijd stil gelegen als gevolg van problemen met het onder tekenen van de Consortium agreements, de MUA's (Material Use Agreement) vanwege een patent op ToBRFV van BASF. Na een interventie van o.a. Naktuinbouw is een overeenkomst opgesteld waarin extra afspraken zijn vastgelegd aangaande het patent en het project. Deze bleek voor alle deelnemers acceptabel en het project is inmiddels weer opgestart. Er is uitstel gevraagd aan het CPVO voor uitloop vanwege het stilliggen.

Doel:

Het ontwikkelen van een of meerdere merkertesten voor resistente genetica van ToBRFV.

De toets zal minimaal worden ontwikkeld voor de monogene HR genetica van de ENZA.

Omdat Syngenta al als enige bestaande rassen met resistente tegen ToBRFV bezit, zal worden bekeken aan de hand van de aan Syngenta gevraagd informatie of het zinvol is om ook daarvoor een merker te ontwikkelen.

Mogelijk komen tijdens de loop van het project nog andere resistentiebronnen bovendrijven waarvoor het ook gunstig lijkt een merker te ontwikkelen.

Voor maximaal 2 andere dan de ENZA genetica zal worden geprobeerd een merkertest te ontwikkelen.

Voortgang:

ToBRFV tomaat

Er is een online bijeenkomst geweest op 10 november waarin de opstart is besproken en wat de nieuwe tijdlijn zal worden.

Naktuinbouw doet zoals bekend alleen deel aan het merker deel en daarvoor is het test plan opgesteld en door GEVES met de deelnemers gedeeld. DNA extracten zullen eind november opgestuurd worden naar de deelnemers.

Aphis meloen

Er is een online bijeenkomst geweest op 29 september waarin de opstart is besproken en wat de nieuwe tijdlijn zal worden.

De verschillende stammen die waren verzameld door INRAE hebben het door het uitstel niet allemaal overleefd. Gelukkig hebben 3 stammen die belangrijk zijn het wel overleefd waarvan 1 bij een bedrijf en deze 3 zullen worden opgestuurd naar de deelnemers.

VAT merker: Naktuinbouw doet alleen mee aan dit merker deel en heeft met de opgevraagde gegevens een merker kunnen ontwikkelen voor gebruik in het project. Tijdens de ontwikkeling zijn ook al een paar foute claims in meloenen aanvragen achterhaald.

Financiële verantwoording:

Het budget van de Raad voor plantensoorten is volledig benut.

Knelpunten:

Er waren grote problemen met de ondertekening van de Consortium agreements en de MUA's vanwege een BASF patent. Dat is pas net opgelost. Daarom kon nog niet eerder worden gestart.

Strategische conclusie:

De ontwikkelde merkertesten zijn geschikt om de kenmerken vast te stellen. Vervolgonderzoek loopt als CPVO project met CPVO financiering. Na dit project kunnen deze kenmerken gebruikt worden in het DUS-onderzoek.

2022-4 Merker ontwikkeling L-genen Tobamo resistentie

Introductie:

Paprika is een van de grote gewassen qua jaarlijkse aanmeldingen, T.b.v. het DUS-onderzoek worden de aanmeldingen getoetst op resistentie met de relevante patho-typen van verschillende Tobamo-virussen (TMV en PMMoV)

De uitgevoerde toetsen voor 2021 zijn:

P0. 19 aanmeldingen

P1,2 29 aanmeldingen

P1,2,3 58 aanmeldingen

Totaal: 106 aanmeldingen

In de literatuur (Tomita et al. 2010) is de sequentie van het L gen met 4 allelen (L1,L2,L3,L4) beschreven die verantwoordelijk worden gehouden voor resistentie tegen Tobamovirus patho-typen. Tevens is de correlatie beschreven tussen de aanwezigheid van één of twee van de vier beschreven allelen en het vatbare of resistente fenotype. Onderstaande tabel maakt inzichtelijk wat de werking is van de allelen en de bijbehorende resistente/vatbare fenotypen. In het kort geeft allel L1 resistentie tegen pathotype P0. L2 geeft resistentie tegen pathotype P0 en P1. L3 geeft resistentie tegen pathotype P0, P1 en P1,2 en L4 geeft resistentie tegen pathotype P0, P1, P1,2 en P1,2,3.

Pepper Tobamovirus Group	0	1	2	3
ISF Code →	TMV: 0,1,2 ToMV: 0,1,2 BPMoV	TMGMV PaMMV	PMMoV: 1.2	PMMoV: 1.2.3

Differential hosts	Gene	0	1	2	3
Lamu, Early Calwonder	-	S	S	S	S
Tisana, Yolo Wonder	L1	HR	S	S	S
Tabasco	L2	HR	HR	S	S
Solario F1, Novi 3, PI159236	L3	HR	HR	HR	S
Tom4, PI260429	L4	HR	HR	HR	HR

S = susceptible; HR= highly resistant

All isolates and differential hosts are used by the industry

Bron ISF:https://worldseed.org/wp-content/uploads/2020/04/Pepper_tobamo_virus_february2020final.pdf?_ga=2.264411087.1353406744.1654693197-537912007.1648472950 (08-06-2022)

Van allel L1 zijn verschillende varianten bekend. Allel L1C Geeft resistentie tegen dezelfde pathovars als allel L1, en L1C lijkt stabiel te zijn bij hogere temperaturen terwijl de werking van allel L1 dan afneemt. Het L1 gen is tot op heden weinig gebruikt in moderne rassen. Over mogelijke variatie in het wildtype L+ is weinig bekend.

Het aantonen van de allelen in een multiplex Q-PCR assay kan mogelijk gewicht in de schaal leggen bij twijfel over bio-toets uitslagen. Als blijkt dat de merkertoets de bio-toets altijd goed kan voorspellen, kan deze waarschijnlijk worden opgenomen in de officiële UPOV en CPVO protocollen. Dit zal leiden tot een aanzienlijke kostenreductie voor het DUS onderzoek van paprika.

Methode:

Om de sequenties uit Tomita et al [1] te verifiëren met Sanger sequencing zijn er verschillende primers ontworpen die de totaliteit van het L gen amplificeren, hierop kunnen vervolgens primers worden ontworpen die de verschillende allelen aantonen. Zie tabel 1.

Uit een lopende proef zijn bladmonsters genomen waaruit via de standaard Naktuinbouw CTAB methode DNA is geïsoleerd.

Tabel 1. Primers voor de amplificatie van L-genen op basis van [1]

Naam	Sequentie (5'-3')	Positie
Fw1_21	CAGCTTTGAATGTTCTCT	21
Rv1_787	CCCTTTAGGCTTTCCT	807
Fw2_833	CTTGTTGTCCTTGATGAC	833
Rv2_1603	GAGAGCGGTTTCAATTTTC	1603
Fw3_1624	GTCAGAGCAGCTGAG	1624
Rv3_2384	GGCAAGGAAAAACAGTC	2384
Fw4_2374	CAACTGCAAGGACTG	2374
Rv4_3051	TATCGAGTCTTTCAGTCC	3051
Fw5_3049	TGGGACTGAAAGACTC	3049
Rv5_3743	GATAGTATAGAGAGGGAAGAG	3823

Tabel 2. Gebruikte rassen uit proef 202200038.

Proeftuinnummer	PT-kaartboek	Vastgestelde naam
811	Tm0 PVY TSWV Xcv	Clair
920	Tm0 TSWV	Teatino
765	Tm0 TSWV Xcv z-anth	Regulator
764	Tm0 TSWV Xcv z-anth	SV6947PB
948	Tm0 Xcv	Carcassone
797	TM0, PVY0, TEV, Xcv 1-10	Placepack
799	Tm0, PVY0, Xcv 1-10, TEV,	Provider
809	Tm0, PVY1-2, TSWV, CMV+Lt	Balta
748	Tm2	Red Tatin
908	Tm2 PVY(0) TSWV	Doddo
814	Tm2 PVY0,1,1-2, TSWV Xcv Nem PepMoV?	Selamar
770	Tm2 TSWV	Kpop
905	Tm2 TSWV	Dost
916	Tm2 TSWV	Cazibe
935	Tm2 TSWV	Verdolino
911	Tm2 TSWV PM geen anth. op webste ook Lt	Briot
775	Tm3	
901	Tm3 PVY0 1 1-2 TSWV Xcv	Criptonio
788	Tm3 TSWV	Polepos
924	Tm3 TSWV	Palermo Ramsey
851	Tm3 TSWV	Zumba
891	Tm3 TSWV Lt	Gambito
894	Tm3 TSWV Lt	Navel
835	vatb	OP 1745
941	vatb	Bastan
942	vatb	Kabala

Om uit te sluiten dat de eerste Sanger sequencing resultaten ruis bevatten door heterozygotie zijn er ook ouderlijnen bemonsterd om te sequencen. Zie tabel 3. DNA is geïsoleerd met de standaard Naktuinbouw CTAB methode.

Tabel 3. Gebruikte rassen uit proef 202200599.

Proeftuinnummer	PT-kaartboek	Vastgestelde naam
1129	vatb	SENG 9239
1130	vatbaar;	SZZ28EC102
1131	Tm0	SIT28EC103
1132	Tm0	OP2617
1133	Tm2	OP2424
1134	Tm2 GMS	SBYXD15121
1135	Tm3	OP2363
1136	Tm3	1180006 RZ
1137	Tm3	SBYX110002
1138	Tm3	San Siro

Aan de hand van de beschreven sequenties zijn verschillende primers ontwikkeld die in een multiplex Taqman PCR de verschillende L-allelen aantonen. De sequentie, labels, quenchers zijn te zien in tabel 4. De gebruikte accessie nummers van de sequenties waarop de primers gebaseerd zijn zijn te zien in tabel 5. Alternatief is geprobeerd op met behulp van een melting curve analyse beschreven in Yang et al [2] de verschillende Allelen aan te tonen.

PCR programma voor de multiplex Taqman.

```
1 95,0 C for 10:00
2 95,0 C for 0:15
3 57,0 C for 0:48
  + Plate Read
4 GOTO 2, 39 more times
  END
```

PCR programma voor de melting curve analyse.

```
1 95,0 C for 10:00
2 95,0 C for 0:30
3 57,0 C for 0:45
  + Plate Read
4 GOTO 2, 40 more times
5 Melt Curve 65,0 to 95,0 C, increment 0,5 C,
  0:05 + Plate Read
  END
```

Tabel 4. Ontworpen primers voor het aantonen L-gen allelen.

Primer naam	Primer Sequentie (5'-3')	Label 5'	Label 3'	Temp	Start positie	Eind positie	Lengte	SNP
L1,L1A,L1C Fw	TGAACGGTCGAAAGGAGTG			54,2	3325	3571	246	3534
L1,L1A,L1C Rev	GAAGCCCTTGTTCCAGCA			53,6				
L1,L1A,L1C Probe	TTCGTAAATTACCTCAAAT	6FAM	BHQ1	67				

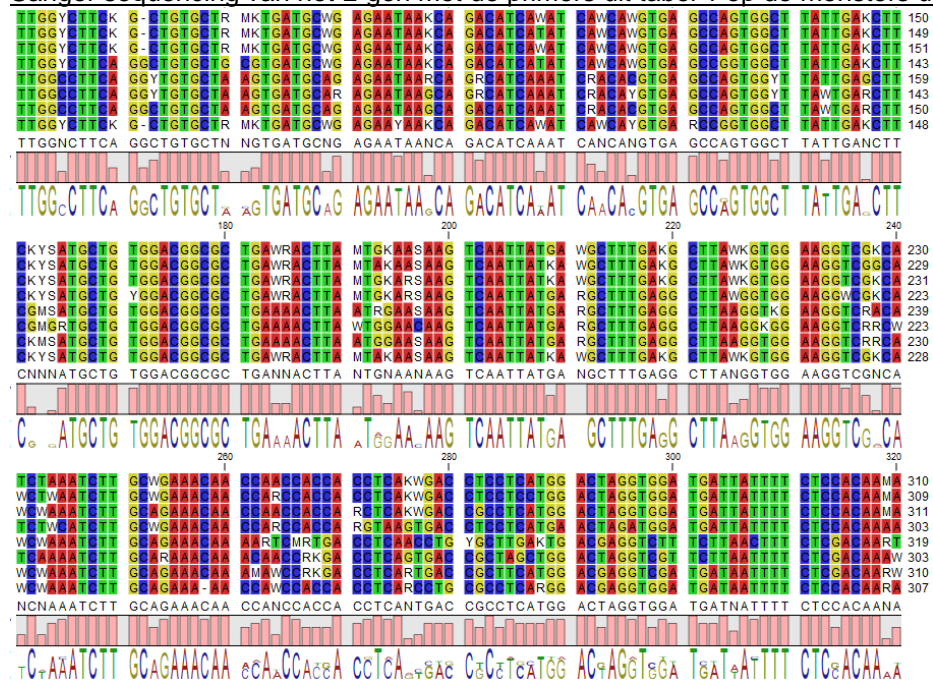
L2 Fw	CCAAGAGCACGCACCTTTGA			56,1	3007	3203	196	3106
L2 Rev	TGCATACGTTCTGGCAGC			55,1				
L2 Probe	ATATTTCAACATTCTCACAA	Atto 532	BHQ1	67,8				
L2B Fw	GTCACTGCTAGAACAAGGGC			55,2	3549	3773	224	3620
L2B Rev	TGCTGATTTGGGAAGGGATTG			55,2				
L2B probe	CTCCATTCTCTACAAG	Texas Red	BHQ2	67				
L3, L1C Fw	CAAGAGGGTGCTGCATAACA			55,4	1707	1953	246	1840
L3, L1C Rev	CAACTTCTCCATCTGCAGCG			58,1				
L3,L1C Probe	TTTCTCAAACAGAGATTACAA	Atto 647N	BHQ2	67,7				
L4 Fw	AGAGAGTTGTTTCATCCGCCA			56,1	3370	3569	199	3517
L4 Rev	AGCCCTTGTTCTAGCAGTGA			56,1				
L4 probe	TCTCTTGAAACTCTAGATT	Quasar 705	BHQ2	66,8				
L4RP-3F	TCTTCAGCACCTCAATTCGGT TC			58,2				
L4RP-3R	GAAGAGGGCATCCCTTTT ACT			54,2				
3endR	TCACAGGCATTCACAGTCAA CAT AGT GCG ACC			66,7				

Tabel 5. Gebruikte accessie nummers voor de sequenties van de L-genen.

Sequentie NCBI	Accession number
<i>Capsicum annuum</i> L1	AB523372.1
<i>Capsicum annuum</i> L1a	AB523373.1
<i>Capsicum baccatum</i> L2b	AB523376.1
<i>Capsicum chacoense</i> L4	AB523377.1
<i>Capsicum chinense</i> L1c	AB523374.1
<i>Capsicum chinense</i> L3	AB523370.1
<i>Capsicum frutescens</i> L2	AB523375.1

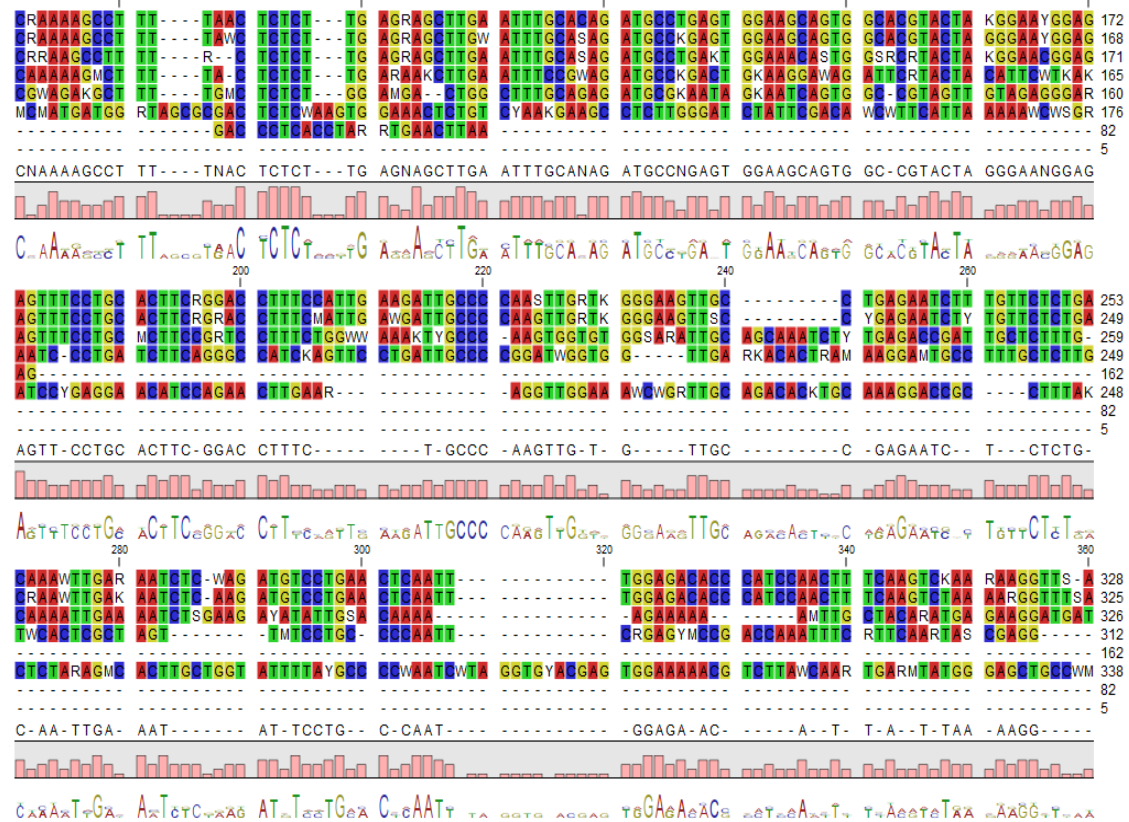
Resultaten:

Sanger sequencing van het L-gen met de primers uit tabel 1 op de monsters uit tabel 2

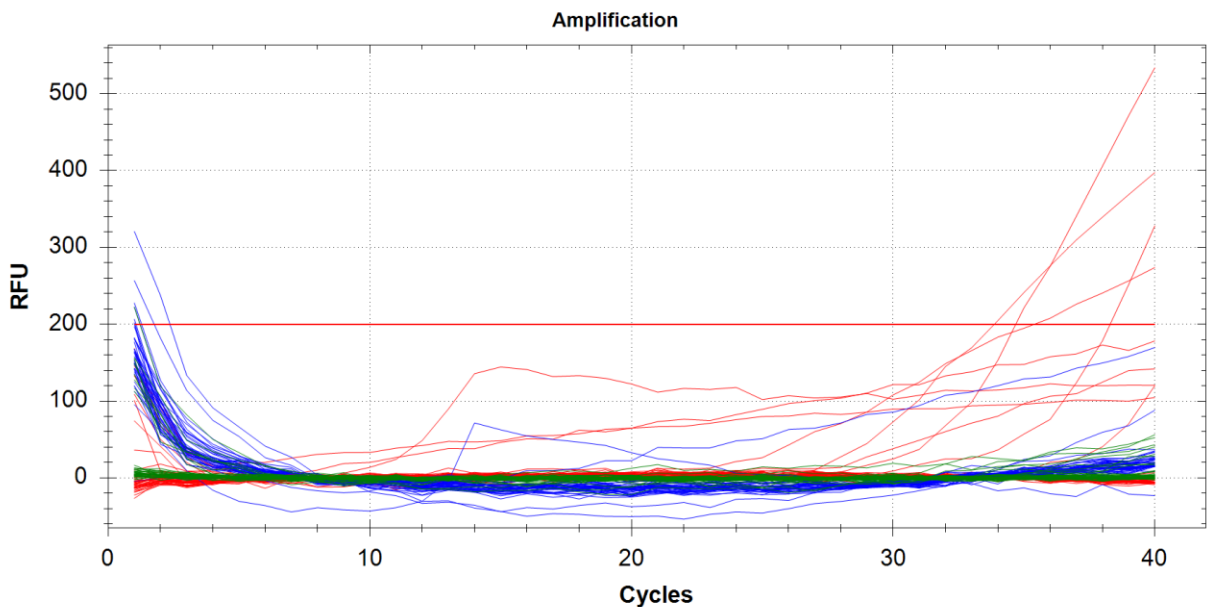


Figuur 1. Weergave in CLC workbench van de resultaten van het sanger sequencen van een aantal monsters. Te zien is dat er veel onzekere datapunten zijn.

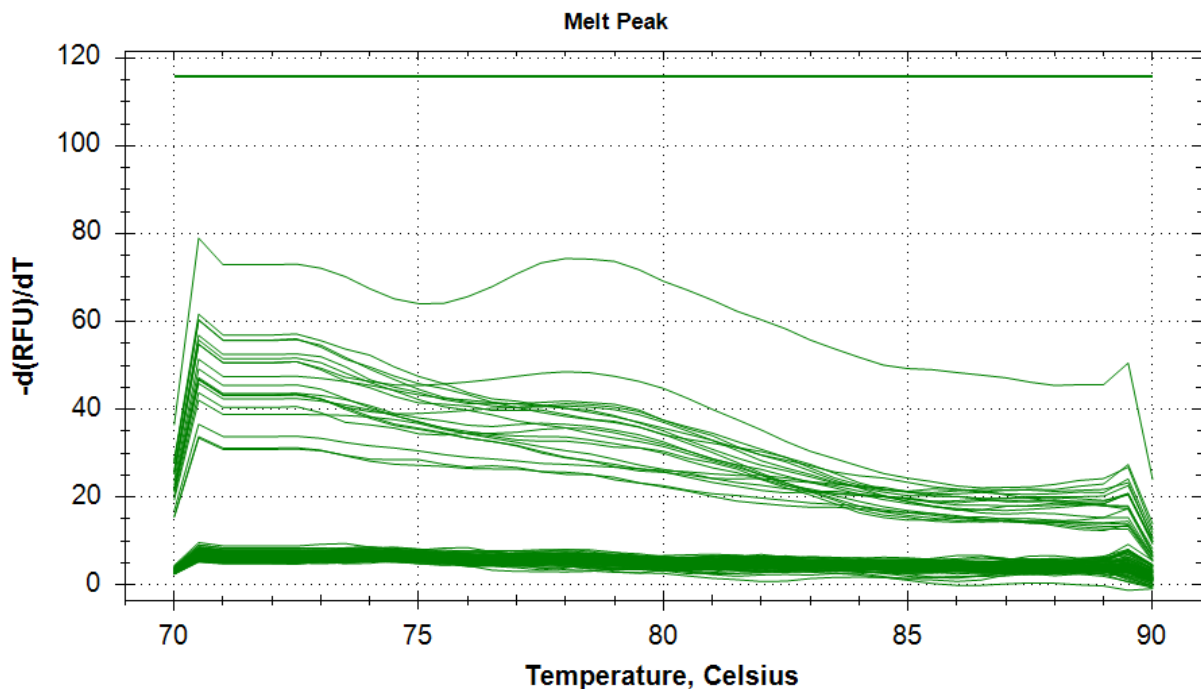
Sanger sequencing van het L-gen met de primers uit tabel 1 op de monsters uit tabel 3



Figuur 2. Weergave in CLC workbench van de resultaten van het Sanger sequencen van een aantal monsters. Ook hier zijn veel onzekere datapunten te zien. Ontwikkelde multiplex Taqman primers op basis van de literatuur.



Figuur 3. Resultaten van de primers, tabel 4, ontworpen op de sequenties uit NCBI, te zien in tabel 5. Geen van de probes geeft signaal, de resultaten zijn geverifieerd op agarose gel waarop te zien is dat er geen product gevormd wordt.

Ontwikkelde Taqman primers voor melting curve analyse.

Figuur 4. Resultaten melting curve analyse. Te zien is dat er geen onderscheid kan worden gemaakt tussen de verschillende allelen van het L gen. De resultaten uit [2] worden niet gereproduceerd.

DiscussieSanger sequencing van het L-gen met de primers uit tabel 1 op de monsters uit tabel 2 en 3.

De ruis in de Sanger sequencing resultaten lijken niet te komen door heterozygotie. Mogelijk is er specifieke amplificatie doordat het L gen meerdere homologen heeft.

Ontwikkelde multiplex Taqman primers op basis van de literatuur.

De gekozen primers hebben geen resultaat opgeleverd.

Ontwikkelde Taqman primers voor melting curve analyse.

De resultaten uit [2] konden niet worden gereproduceerd.

Nog uit te zoeken:

Mogelijk andere PCR programma's voor de melting curve analyse. Selectie van andere SNPs voor de multiplex Taqman. Sanger-sequenzen lijkt geen optie, om de sequenties uit NCBI te verifiëren kan er mogelijk gebruik worden gemaakt van nanopore sequencing.

Strategische conclusie:

Het project heeft geen bruikbare methode opgeleverd. Dit betekent dat voor deze kenmerken biotoetsen noodzakelijk blijven.

2022-10 Verbeteren van DUS onderzoek voor hennep door gebruik van DNA database.

Operationele conclusies:

Project afgerond.

De hennep DNA database verbetert het DUS-onderzoek tijdens het onderzoeksproces.

Onderscheid

Met bevestiging uit de DNA database kan er een consistente conclusie worden gegeven over onderscheid.

In de DNA database zijn vijf grote onderscheidbare clusters en enkele kleine clusters gevonden.

Rassen met 100% onderlinge DNA match, bleken vaak morfologisch identiek, met uitzondering van een goed te onderscheiden mutant en enkele gevallen waarbij er voldoende onderscheid kon worden aangetoond.

Rassen met een onderlinge DNA match hoger dan 85% en twijfel over voldoende morfologisch onderscheid vereisten een tweede jaar DUS-onderzoek om side-by-side een conclusie te trekken over voldoende onderscheid.

Rassen met een onderlinge DNA match lager dan 85% toonden voldoende morfologisch onderscheid.

Uniformiteit

Voor alle aanmeldingen kan genetische uniformiteit worden bepaald door het DNA te toetsen en te vergelijken met de database. Duidelijk splitsende populaties of off-types kunnen vroeg in de DUS procedure worden doorgegeven. Voor zaad vermeerderde aanmeldingen die zich spreiden door de hele database, is het niet mogelijk om relevante vergelijkende rassen aan te geven, maar kan er als ondersteuning wel een één op één vergelijking worden gedaan.

Doel:

Verbeteren van het DUS onderzoek voor hennep door gebruik te maken van de DNA database tijdens het onderzoeksproces

Voortgang:

Gestelde Cat doelen met resultaat:

Uitbreiding van de referentiecollectie met >150 nieuwe rassen

De referentie collectie is gedurende het project aangevuld met nieuwe rassen, echter door (zeer) beperkte beschikbaarheid zijn dit er significant minder dan 150. In totaal zijn er 41 rassen toegevoegd aan de database. Vanuit het NÉBIH en GEVES zijn een reeks additionele rassen/monsters aangeleverd. De monsters (n=8) vanuit het NÉBIH bleken allemaal reeds aanwezig in de database. Echter waren er van deze rassen maar een beperkt aantal profielen aanwezig. De toevoeging van extra individuen draagt bij aan een hogere kwaliteit van de database en diende tevens als validatie van de methodiek. Binnen de rassen aangeleverd door GEVES (n=9) bleken 6 rassen nog niet bekend binnen de database.

Van alle nieuwe rassen (uitbreiding en aanmeldingen) DNA en DNA profielen op basis van GT-Seq in de database.

Tot op heden zijn alle aanmeldingen en referenten gegenotypeerd met behulp van GT-seq.

Voor- en nadelen analyse van een DUS onderzoek met methode A (alleen morfologie) en methode B (een combinatie van morfologie en DNA).

In de DUS proeven van 2020, 2021 en 2022 werd informatie uit de DNA database gebruikt ter ondersteuning. Voor deze proeven is geanalyseerd welke aanmeldingen een DNA match hoger dan 85% hadden, en wat de beste vergelijker en eindconclusie was m.b.t. methode A (alleen morfologische data) en methode B (combinatie van morfologische en DNA data). De vergelijking van beide methoden staat in tabel 1. De similariteit van DNA is in deze tabel in % weergegeven en de morfologische overeenkomst in note 1 t/m 5 volgens de uitleg onderaan de tabel.

We gebruiken nu al methode B omdat deze alleen voor ons maar voordelen kent, zie tabel 2. Waar verwezen wordt naar cellen in tabel 1 zijn deze geel gemaakt.

Tabel 1 Vergelijking van methode A en B bij aanmeldingen met een DNA match hoger dan 85%.

RVPnr	rasnaam	Voorlopige aanduiding	similariteit dichtsbijzijnde, grens 8%	Groter cluster	beste morf. verg.	sim. note (*)	beste DNA verg.	sim. note (*)	Conclusie methode A (morf.)		Conclusie methode B (morf.+DNA)	
									Conclusie na 1e proef	Conclusie na 2e proef	Conclusie na 1e proef	Conclusie na 2e proef
HNP212	MGC 1050	MGC 1050	87	NH420 cluster	GRX53	2	NH420	5	positive	X	doubt	X (withdrawn)
HNP216	MGC 1056	MGC 1056	100		MGC 1055	3	MGC 1055	3	positive	X	doubt	X (withdrawn)
HNP240	Debicea	RQS010	90	Debicea cluster	MGC 1011	2	MED-1337	3	positive	X	positive	X
HNP246	just mary 1	just mary 1	86,5		zelfst	5	MGC 1042	5	doubt	positive	positive	X
HNP252	Dopotan	L4	98	Sibari cluster	MGC 1037	1	Sibari	niet in de proef	positive (ref.=X)	X	doubt	waiting for referent.
HNP261	MGC 1037	MGC 1037	98	Sibari cluster	MGC 1046	4	Sibari	niet in de proef	positive	X	doubt	X (withdrawn)
HNP291	BZV	BZV	100	BZV cluster	MGC 1054	5	MED-1337	5	positive	X	doubt	negative
HNP297	PFCP	PF-CP	-		G261	1	X	X	doubt	positive	positive	X
HNP305	VC - Fresh Pie	VC-Fresh Cake	92,5	BZV cluster	Debicea	4	MED-1337	5	positive	X	doubt	positive
HNP318	MGC 1054	MGC 1054	98,5	BZV cluster	MED-1337	4	MED-1337	3	positive	X	negative	X
HNP328	MGC 1106	MGC 1106	98,5		MGC 1101	1	MGC 1101	1	doubt	negative	doubt	negative
HNP356	Tonic	ct11	98	Sibari cluster	X	X	X	X	not U	X	negative D + U	X
HNP385	V2 Orange Honey	A2	?	Segura cluster	HURV1979S	1	HURV1979	1	doubt	positive	doubt	positive
HNP400	BEDRO 01	BEDRO-01	100		Bedrocan	1	Bedrocan	1	doubt	negative	negative	X
HNP403	EVLS 118	EV 118	100	BZV cluster	MED-1337	1	MED-1337	1	doubt	negative	negative	X
HNP408	MGC 1155	MGC 1155	86	Royal GRL cluster	Royal GRL	2	Hulkberry	5	positive	X	doubt	positive
HNP412	MGC 1074	MGC 1074	100	BZV cluster	MED-1337	1	MED-1337	1	doubt	negative	negative	X
HNP415	MGC 1121	MGC 1121	100	BZV cluster	MED-1337	1	MED-1337	1	doubt	negative	negative	X
HNP416	MGC 1122	MGC 1122	100		MGC 1040	3	MGC 1040	3	positive	X	positive	X
HNP417	MGC 1128	MGC 1128	100		Yrtish	3	EV 119	niet in de proef	positive	X	doubt	X (ref.=withdrawn)
										8x bis		8x bis

(*) uitleg notes

Note 5 niet opgeschreven als mogelijke vergelijker

Note 4 wel opgeschreven, maar niet onderstreept als beste vergelijker

Note 3 onderstreept als beste vergelijker, maar in de kas al 'voldoende verschil'

Note 2 onderstreept, in de kas 'dichtbij', maar na analyse van alle kenmerknotes incl. inhoudstoffen toch verschillend

Note 1 onderstreept, in de kas 'dichtbij', en na analyse van alle kenmerknotes incl. inhoudstoffen hetzelfde of bis.

Tabel 2. Analyse van de voordelen van methode B.

Efficiëntie	kostenbesparing	Veel kleinere proeven doordat er minder vergelijken nodig zijn in de proef en dus minder rassen te vergelijken.
Efficiëntie	kostenbesparing	Met minder vergelijken in de proef is er veel minder tijd nodig voor het beoordelen en vergelijken.
Efficiëntie	tijdwinst	Bij twijfel in de proef, bijv. door wisselende proefcondities, kan de DNA database bevestiging geven en voorkomen we een 2e proef (zie tabel 1: bij methode B hoefde er 2 x minder een 2e proef dan bij A).
Kwaliteit	minder fouten	Als een vergelijker door omstandigheden niet in dezelfde proef staat en we hem uit de database van rasbeschrijvingen uit verschillende proeven zouden missen, komt de vergelijker toch naar voren uit de DNA-database. (zie tabel 1: in 1 geval wachten we op de levering en verificatie van nieuwe planten).
Kwaliteit	minder fouten	Ook als de vergelijker wel in de proef staat geeft methode A soms een foute conclusie (zie tabel 1: dit kwam 2 x voor). Meestal komt dit door uitgangsmateriaal van verschillende grootte en/of wisselende proefcondities.
Kwaliteit	minder fouten	Het melden van een hoge DNA match aan de aanmelder zorgt er voor dat deze zijn ras soms zelf al intrekt omdat hij weet dat de rassen hetzelfde zijn of te dicht bij elkaar liggen (tabel 1: dit kwam 4 x voor). Een evt. 2e proef was niet meer nodig.
Kwaliteit	Beter juridisch bewijs	In geval van inbreuk achteraf zijn rechtszaken minder logisch omdat ons dossier completer en waterdicht is.
Toekomstbestendig	Voldoende kas capaciteit	De totale rassencollectie wordt zo groot dat deze niet meer in zijn geheel in de kas past. De DNA database helpt de juiste keuze te maken welke vergelijken in de proef moeten.
Kwaliteit	Onafhankelijk van levende collectie	De instandhouding van een complete levende collectie is duur en kent veel problemen: slechte vermeerdering, moeilijk vegetatief houden van autoflowering rassen, Hop Latent Viroide (HLVd), plantmateriaal is moeilijk verkrijgbaar, etc. Een DNA database kan een incomplete levende collectie ondervangen en is makkelijker uit te breiden met rassen uit landen buiten de EU.

Nieuwe procedure voor het DUS onderzoek van hennep (inclusief nieuw CPVO protocol en gebruik van DNA database).

Er is een nieuw CPVO protocol (CPVO/TP-276/2-Rev) geaccepteerd met meer kenmerken die speciaal voor niet-vezeltypes gebruikt kunnen worden, wat het rapporteren van onderscheid vergemakkelijkt. Het aantal aanvragen is inmiddels gestabiliseerd, dit maakt het onrendabeler om altijd de hele levende rassencollectie (168 rassen) in de DUS proef op te nemen. Het is efficiënter en kostenbesparend om naast de standaardrassen alleen de vergelijkers op te nemen met hoge overeenkomsten in de TQ-kenmerken en/of het DNA. De standaardrassen blijven nodig voor het maken van de rasbeschrijvingen en de kalibratie van de proeven onderling.

Hiervoor zou het DNA van de aanmelding voorafgaand aan de DUS proef met de DNA Database vergeleken moeten worden, om daarna de op te nemen vergelijkers in de DUS proef te kunnen kiezen. Dit zou een nieuw voorbeeld voor UPOV TGP/15/3-Model II kunnen worden (Combining Phenotypic and Molecular Distances in the Management of Variety Collections).

Model hoe we de database op den duur kunnen blijven vullen, de kosten daarvan en wie dat moet betalen

Door het mee te laten rekenen in de "cost calculation"

Financiële verantwoording:

Het budget voor 2023 is niet volledig benut.

Knelpunten:

Er waren minder goed gekarakteriseerde referentierassen beschikbaar dan verwacht, hierdoor zijn er minder nieuwe rassen aan de DNA database toegevoegd. Er zijn weinig nieuwe vezelrassen geregistreerd, maar in Bulgarije zijn in 2023 wel 12 nieuwe rassen geregistreerd met ingrediënt-gerelateerde rasnamen (Pain killer, Strawberry H, OGKush, Arizona Dream etc.) die nog moeten worden opgevraagd. Voor de niet-vezelrassen bleek het verkrijgen van bladmateriaal uit het buitenland zonder opium-importvergunning niet toegestaan en het opsturen van DNA-extracten mag wel maar is een ingewikkelde procedure. Er zijn wereldwijd wel veel nieuwe niet-vezelrassen met PBR bijgekomen (in bijv. Israël, Australië, USA, Canada, Argentinië, Zwitserland en de UK) die we zouden willen opvragen zodra we daar een werkbare procedure voor hebben.

Wegens hoge werkdruk en beperkte hoeveelheid beschikbare FTE bij zowel R&D als RAS heeft het project gedurende het jaar vertraging opgelopen. Hierdoor kon de analyse voor de relevante genetische similariteit (moleculaire treshold) nog niet worden gedaan.

Strategische conclusie:

De logische vervolgstap voor Naktuinbouw is om de nieuwe DUS methode met DNA (volgens UPOV TGP/15/3-Model II) door het CPVO geaccepteerd te krijgen. Hiervoor is het waarschijnlijk nodig om een statistisch verantwoorde moleculaire threshold (relevant voor Distinctness) te bepalen. Er ligt hiervoor al data klaar.

Daarnaast moeten we een procedure opzetten voor het opvragen van bladmateriaal of DNA-extracten voor de niet-vezelrassen, zodat we de DNA-database kunnen vergroten.

De database is in gebruik in het DUS onderzoek en nieuwe rassen worden aan de database toegevoegd.

2023-b1 Automatisering naamgeving foto's siergewassen

Inleiding

Voor siergewassen waarvoor het DUS onderzoek door Naktuinbouw wordt uitgevoerd, worden foto's gemaakt van de rassen door Floricode. De naam van de foto moet handmatig worden gegeven door de medewerker van Floricode. De medewerker van Floricode slaat de foto op. Er staat op de foto geen referentie met het proeftuinnummer van Naktuinbouw. Eventuele fouten zijn lastig te traceren en recht te zetten.

Uitvoering

Fase 1 nagaan welke methode gebruik moet worden

In deze fase is er onderzocht welke methoden er mogelijk zijn om automatische naamgeving tot stand te brengen. Het maken van een QR-code met daaraan gekoppeld de informatie die we zichtbaar willen hebben blijkt de beste optie. Deze methode is in samenwerking met Verdel ICT tot stand gekomen.

Fase 2 hoe is dit in te passen in het praktische werk

In deze fase is Verdel ICT nauw bij het praktische werkproces betrokken omdat het functioneel ontwerp voor de te maken software hierop moet aansluiten. Het hele proces is onderdeel voor onderdeel door gelopen en heeft het inzicht gegeven dat automatisering van het proces van naamgeving aan de foto's mogelijk is maar dat er geen tijdwinst te behalen is. Er kan zelfs gesteld worden dat het meer tijd gaat kosten. Dit heeft te maken met het feit dat verschillende onderdelen van planten die op de foto gezet worden in 2 verschillende studio's moeten worden gemaakt. Daardoor zal je voor elk ras van studio naar studio moeten lopen terwijl op dit moment eerst alle foto's van een plantonderdeel worden gemaakt in de ene studio en het andere onderdeel in de andere. Doordat je bij een behoorlijk aantal gewassen dit voordeel verliest gaat het gehele proces over alle gewassen heen meer tijd kosten. Na uitvoerig onderleg met Verdel ICT is er besloten om het functioneel ontwerp niet verder te gaan uitwerken.

Fase 3 implementeren in de praktijk

Deze fase is niet van toepassing.

Financiële verantwoording:

Het budget voor 2023 is niet volledig benut.

Strategische conclusie

Er is geen tijdwinst te boeken om het proces van naamgeving van de rasfoto's te automatiseren. Hoe we in de toekomst de link kunnen gaan leggen tussen het proeftuinnummer en het ras afgebeeld op de foto is nog niet duidelijk. Hiervoor zullen we in overleg gaan met alle betrokkenen.

2023-b2 Construction of SNP database of common knowledge of cut rose

Introduction

Rose is one of the largest ornamental crops and one of the most important in many countries (Vosman et al. 2006). The importance of this crop is reflected in the high number of applications for Community Plant Variety Rights each year. The number of applications is the result of breeding activities that take place all over the world and lead to a broad diversity in types and varieties.

One of the major challenges in DUS testing of (cut) rose is to ensure that new applications are clearly distinct from varieties of common knowledge. As described in the final report on 'a European reference collection of rose varieties' by Vosman et al. (2006), over 25.000 varieties of modern roses have been described and over 13.000 varieties were listed for commercial trade in the Combined Rose List of 2004 by Peter Schneider. The Naktuinbouw database contains approximately the descriptions of 3000 cut rose varieties. The quality of the DUS decision therefore depends largely on the management of the reference collection and on the design of DUS trials. In this regard, DUS trials should have an acceptable and workable number of comparing varieties, without missing any relevant variety of common knowledge as a reference.

Relevant reference varieties

Relevant reference varieties are selected based on Technical Questionnaire (TQ) information, photographs, and the advice of the External Group of Crop Experts (EGE). Due to the high costs, it is hard to maintain a living reference collection for cut-rose.

The current system works well but is vulnerable in the future. Intensive breeding activities all over the world lead to increasing numbers of common knowledge varieties and consequently to an increase of similar varieties. For crop experts, it is becoming increasingly challenging to keep a confident overview.

Risks in the current DUS system:

- No full overview and availability of common knowledge varieties in the future: The rapid development of new varieties and the increase in global character of the plant breeding industry, make it an already hard and soon impossible task to keep track of common knowledge in living form.
- Phytosanitary restrictions of importing living reference material: Importing living reference material of common knowledge from outside Europe may be hampered by phytosanitary restrictions. The risks of bringing (new) diseases into the EU. Besides that, it is often very costly and complicated for companies.
- Stability of the variety description: The variety description, which is the ID of a variety in the current system and fully based on phenotype, is highly influenced by climate and other environmental factors. For example, when breeding takes place in other climate zones, the variety description (and photographs) that are provided with the TQ can differ considerably from the expression at the EOs responsible for the DUS tests. This might result in the selection of wrong comparing varieties with the potential result that trials have to be repeated in additional year(s) with relevant comparing varieties. These external environmental factors hamper the reliability of comparing variety descriptions. At this moment it is not possible to check or verify the reliability of the TQ information.
- Difficulty to exclude comparing varieties based on phenotypic descriptions only: Based on the information provided on the Technical Questionnaire (TQ) it has been increasingly difficult to reliably exclude comparing varieties as the differences between varieties tend to get smaller. As a result, DUS trials are becoming larger (more comparing varieties) and therefore more expensive.
- Control on mutant varieties: Currently, it is not possible to check if the candidate variety concerns a seedling (crossing) or a mutant. This could affect the uniformity decision because the submission of the number of cuttings is different between a seedling and a mutation variety.

DUS examination can be improved with DNA as a supportive tool

DNA profiles available in well-organized databases with DNA data of varieties of common knowledge, are considered as not influenced by the environment and are a valuable tool to guarantee the efficiency and quality of DUS tests. Some advantages are listed below:

- No restrictions on the number of varieties of common knowledge in such DNA database.

- DNA profiles are not sensitive to external environmental factors and are considered as an objective description of the genotype.
- The use of a DNA database for rose for the management of reference collections, as described by UPOV as an approved model in UPOV/INF/18 and UPOV/TGP/15, could support the DUS research and make up for the current risks and challenges described above.
- As a spin-off, a DNA database can also be applied to answer all kinds of variety identification and verification questions and for enforcement of Plant Breeders' Rights. We expect the availability of a DNA database for cut rose will strengthen the position of the PBR titleholders and their possibilities to enforce their rights.

The first step to support the DUS testing system is to create such DNA database of common knowledge varieties. The more varieties in the database, the most accurate overview of common knowledge, and the best quality and added value the database has for DUS testing. The generation of such a rose DNA database the result of this project.

Project goal:

DNA database of common knowledge varieties of cut rose.

Construction of a DNA database of common knowledge varieties of cut rose.

DNA samples from all candidate varieties submitted to CPVO between 2011 and 2017 (done on an automatic basis in the framework of a specific CPVO initiative valid during this period) and from many additional EU candidate varieties applied between 2017 and 2023 (on request of the applicants, in the framework of the invoiced service proposed by CPVO) was already collected and stored at Naktuinbouw. Naktuinbouw's R&D team was responsible for the DNA extractions and storage of these varieties during this period. The number of varieties for which a DNA sample was available is displayed in Table 1. For the applications stored between 2017 and 2023, the breeders gave their consent to include the samples for genotyping. These signed consent letters are stored at Naktuinbouw.

Year	Number of DNA samples of cut-rose application in storage
2011	85
2012	87
2013	72
2014	85
2015	77
2016	67
2017	33
2018	51
2019	27
2020	35
2021	71
2022	65
2023	81
Total	836

Table 1: Overview of the number of cut-rose applications from which a DNA sample has been extracted and stored by Naktuinbouw from 2011 to 2023.

Material and Method

In previous projects, a SNP set with 129 SNP markers and data analysis pipeline for tetraploid varieties were developed. The samples from Table 1 were genotyped with these markers, through the GT-seq (Genotyping in Thousands by sequencing) method described by Campbell et al 2015.

DNA concentrations were measured with a SPARK® multimode microplate reader, and samples were subsequently diluted to 17,5-35,0 ng/µl (samples with lower DNA concentrations were not diluted). Next, the samples were genotyped with the GT-seq protocol. In PCR 1 the rose-specific GT-seq primer mix (129 SNP locations) was used. After tagging and indexing in PCR 2, all samples were pooled per plate (figure 1).

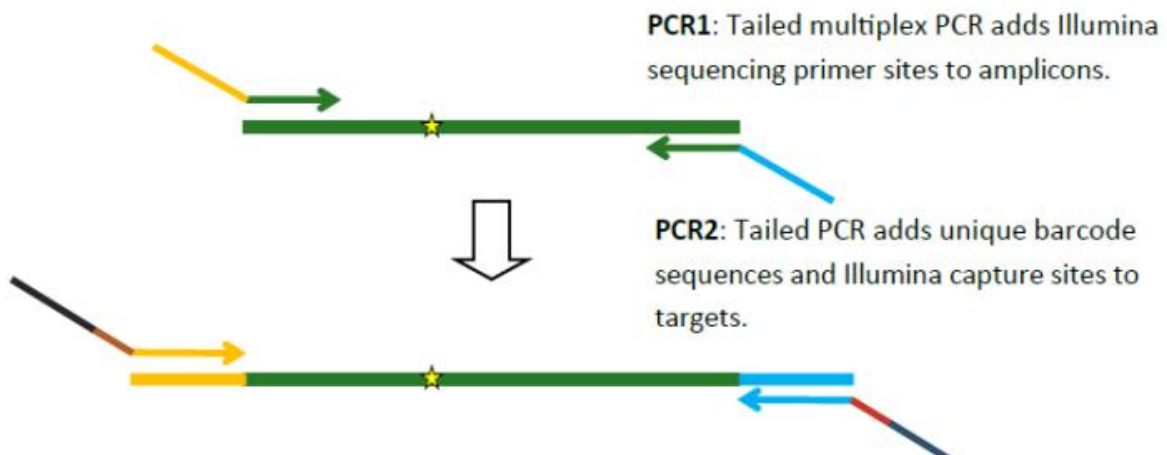


Figure 1: Overview of GT-seq library preparation. Green represents the target sequence to amplify with a known single-nucleotide polymorphism (SNP) designated by the yellow star. In PCR1, the forward primer structure is small DNA primer (yellow) and locus-specific forward primer (green), and the reverse primer structure is read 2 primer (blue) and locus-specific reverse primer (green). In PCR2, the forward primer structure is Illumina P5 capture sequence (black), i5 barcode (brown), small DNA primer (yellow) and the reverse primer structure is Illumina P7 capture sequence (dark blue), i7 barcode (red), read 2 primer (blue). The i5 barcode identifies the well position in a 96-well plate, while the i7 barcode identifies the plate number for each 96-well plate used in the pooled library.

Of the pooled sub-libraries, the PCR product was purified from PCR chemicals, and a bead size selection (selection on desired fragments sizes) ratio of 0,8 was performed (AMPure XP Bead-based reagent). Subsequently, the sub-libraries were checked on product size with the Agilent 5200 Fragment Analyzer and the concentration was determined with the KAPA Library Quantification Kit for the q-PCR. According to the calculation, the sub-libraries were combined in one library per run and prepared for sequencing.

The reads resulting from the sequencing runs were analyzed with the 'Polyploid-Aware pipeline' (tetraploid GT-seq pipeline developed in a previous project R21-012). The first step of the data processing was the demultiplexing of reads based on the barcodes and primers list. The next step was to perform the reads quality check. The reads that passed the quality check were used for mapping to the rose reference genome. Variant calling was done with revised fitTetra and fitPoly R packages (this revision has been done on data handling and mathematical modeling). Based on the revised R packages, the genotypes per variety were called resulting in a genotype table containing the SNP scores per variety.

The genotype tables were imported into the Rose SNP database. Similarities between the varieties were calculated with the distance mapping matrix specific for tetraploids. For the database and calculation of the similarities, the software Bionumerics is used.

Results

- Permission has been received from the variety owners for the 2017-2023 cut-rose applications.
- All new entries were added in duplo to the database. The number of varieties entered into the database is given in Table 2.

Year	Total number of varieties added to the database	Applications	References
2011	100	85	15
2012	108	87	21
2013	124	72	52
2014	99	85	14
2015	77	77	0
2016	67	67	0
2017	126	33	93
2018	108	51	57
2019	178	27	151
2020	163	35	128
2021	80	71	9
2022	76	65	11
2023	100	81	19
Total	1406	836	570

Table 2. Number of varieties entered into the database

Conclusion and discussion

In this project, 1406 rose varieties were successfully added to the database. The varieties genetic relations were calculated and checked. Matches were found between 35 varieties. These matches are reported to the crop specialists for further investigation. The database containing the genotypes of these 1406 varieties is now available for use to support the DUS trials in cut-rose and for variety owners in case of infringements or other identification questions.

Finances

The budget is completely spend.

Strategic conclusion:

The SNP database for cut rose will be implemented for daily use in the DUS work process.

References

Campbell, N.R., Harmon, S.A. and Narum, S.R. (2015), Genotyping-in-Thousands by sequencing (GT-seq): A cost effective SNP genotyping method based on custom amplicon sequencing. *Mol Ecol Resour*, 15: 855-867. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12357>

Peter Schneider, 2004: Combined Rose List 2004, The International Rose Directory, P.O. Box 677, Mantua, OH 44255 USA

MiniSeq System Denature and Dilute Libraries Guide (1000000002697)
<https://support.illumina.com/downloads/miniseq-denature-dilute-libraries-guide.html>

Vosman B., C.J. Barendrecht, D. Esselink, H. Jones, E. Scott, B. Spellerberg, S. Tams, (2006) A European reference collection of rose varieties : final report. <https://edepot.wur.nl/121109>

2023-a4 SNP discovery Sla

Operationele conclusies:

Project afgerond.

Het genotyperen van 184 rassen sla (als sub selectie van de genetische diversiteit) heeft geleid tot een bruikbare preselectie van >500 SNPs. Deze preselectie zal worden gebruikt als input voor een Europees project met als hoofddoel het harmoniseren van een SNP set, dit als aanloop op een internationale database SLA, toepasbaar en ondersteunend voor het DUS onderzoek.

Doel:

Het ontwikkelen van een SNP-set (in silico only) voor Sla, welke kan worden aangedragen en geharmoniseerd binnen een Europees vervolg project.

Voortgang:

Vanuit Rassen en proeven is een selectie van 177 rassen aangeleverd te gebruiken voor de SNP discovery. Van 123 rassen bleek DNA beschikbaar in de -20°C vriezer. Dit DNA is afkomstig uit voorgaande project R19-407 Mtd databaseopbouw sla. Voor 54 rassen was reeds geen DNA beschikbaar, deze rassen zijn uitgezaaid in het Variety Center en vervolgens bemonsterd en verwerkt.

De selectie van 177 rassen (inclusief 7 technische replica's) is gegenotypeerd met behulp van de "4K Illumina Lettuce Array", deze array bevat +/- 4500 individuele SNP merkers evenredig verspreid over het genoom. Dit werk is uitgevoerd door "SGS INSTITUT FRESENIUS GmbH" ook wel "TraitGenetics"

Vanuit TraitGenetics zijn de resultaten zoals verwacht gerapporteerd (genotype tabel in Excel). Uit de analyse uitgevoerd door Bio-informatica (intern) bleken +/- 4000 SNPs een hoge kwaliteit te hebben waarbij deze in vrijwel alle monsters zijn gegenotypeerd. Binnen deze 4000 SNPs zijn >500 zeer polymorf binnen de getoetste populatie. Deze zijn geschikt bevonden voor het vervolg project waarbij ook de andere E.O.'s aansluiten. Momenteel is het de eerste versie van het vervolg project ter review aangeboden aan de desbetreffende E.O.'s (BSA, GEVES & INIA-CSIC). Vanuit alle partners is er interesse getoond om aan te sluiten bij een consortium voor de verdere ontwikkeling.

Financiële verantwoording:

Het beschikbaar gestelde budget in 2023 is niet volledig benut.

Knelpunten:

In eerste instantie was binnen het project voorstel de "40K Infinium Array" opgenomen met bijbehorende kosten. Vanuit TraitGenetics (service provider) is vernomen dat er leveringsproblemen waren vanuit Illumina (leverancier Arrays). Gezien de onbekende levertijd van de "40K Infinium Array" is uitgeweken naar de 4K Illumina Lettuce Array. Hoewel deze 4K array maar een kleine sub selectie is vanuit de 40K array doet dit geen afbreuk aan de analyse en de kwaliteit van de resultaten.

Deze kleinere Array zou aanzienlijk eerder beschikbaar zijn waardoor de tijdlijn van het project gehandhaafd kon worden. De door TraitGenetics voorspelde tijdlijn bleek echter niet realistisch. Waar eerst werd verwacht de resultaten op te leveren medio December werd dit januari 2024. Door deze vertraging is het gehele project aanzienlijk vertraagd.

Strategische conclusie:

Door dit project is er internationaal er een lijst van SNP merkers beschikbaar. Hiermee kan een database van rassen van algemene bekendheid worden gevuld. Met dit doel is er is een vervolgproject ingediend bij het CPVO voor een gezamenlijke SNP database (in samenwerking met GEVES, BSA en INIA).

Tussenrapportages

2023-a1 Showcase boon 2.0

1. Operational conclusions:

The research is being carried out as planned

2. Purpose of the project

- International acceptance of a method in which DNA research is used in bean to arrive at the right set of comparators in the field.
- Collecting DNA from new bean varieties, to keep the collection complete.
- Optimization of the SNP set compared to previous set used in previous projects R20-002 and R21-009.

3. Progress

Initially waited on results from microhaplotype project (R23-405), but results showed limited added value of this resource. Decision was taken not to make use of this resource in the current project.

In July 2023, a curated set of hard-to-distinguish samples was sent to DNA Link in Korea for more in-depth sequencing. Both datasets have been received from Korea (library 1 on Nov 2023 and library 2 on Dec 2023). The sequencing depth is far more than anticipated which caused the delay in the data delivery process. As such, the analysis pipelines will need to be adjusted for SNP calling in multiple iterations using subsamples.

4. Estimated date of completion

Probable End Date:	01-12-2025
Earliest possible end date:	01-06-2025
Last possible end date:	31-12-2025

5. Bottlenecks

Due to dependence on project microhaplotypes, the project started with a slight backlog. The sequencing data arrived at the end of 2023, causing the delay in the project progress (i.e. the start of data analysis by the Bioinformatics Team couldn't start on planned time). Budget wise, that led to not all being used in 2023. In addition, given the larger anticipated depth of the sequencing data, an expected delay in the project is expected. Hopefully, sub-sampling from the huge data will already give us some indications.

6. Financial accountability

Due to dependence on project microhaplotypes, the project started with a slight backlog. The sequencing data arrived at and of 2023, causing a delay in the project process. Therefore not all of the budget has been used.

7. Conclusion

Besides of the delay in this project are the developments and interim results of this project conform expectations.

2023-a6 Merkerontwikkeling voor *Verticillium* resistentie in tomaat-vervolg

Operationele conclusies:

Het project wordt volgens projectplan uitgevoerd.

Doel:

1. Specificiteit verhogen van de VE1/ve1 assay en inzicht krijgen (en merker ontwikkeling in dien haalbaar) van de genetica bij de rassen waarbij er geen Ve1/ve1 allel wordt aangetoond.
2. Vaststellen van het biotoets fenotype behorende bij het genotype Ve1ve1ve2ve2 in 4 door tijd gescheiden toets momenten. Inzicht krijgen op de eventuele invloeden van externe factoren in de biotoets aan de hand van rassen met het genotype Ve1ve1ve2ve2.

Voortgang:

De genetica is erg complex. Met de sequentie data die momenteel aanwezig is, was het niet mogelijk om de primers specifiek te maken. Hierdoor is het voor nu nog niet mogelijk om doel 1 te kunnen behalen. In een Nanopore project, waar onderzoek wordt gedaan naar longread sequencing, zullen de Ve1 en Ve2 genen meegenomen worden om mogelijk meer inzicht te krijgen in de complexe genetica.

De laatste biotoetsen voor de rassen met het genotype Ve1ve1ve2ve2 zijn uitgevoerd. De resultaten worden geanalyseerd.

In 2024 zal de eindrapportage geschreven worden. Als de resultaten publicatie waardig zijn, zal er een publicatie geschreven worden.

Financiële verantwoording:

Het budget van 2023 is volledig benut.

Knelpunten:

De genetica van de genen is erg complex, hierdoor is het niet gelukt om de merker verder te optimaliseren. Er zal in een nanopore project, verder onderzoek aan de genen gedaan worden.

Conclusie:

We verwachten dat met behulp van de beslissing matrix, de Ve merkers (na acceptatie en opname in UPOV en CPVO protocollen) gebruikt kunnen worden ter ondersteuning van het DUS onderzoek.

2023-a7 Nieuwe methodes voor vegetatieve vermeerdering van gewone es (2023-2024).

Operationele conclusie:

Het project wordt volgens planning uitgevoerd.

Doel

Het vermeerderen van de gewone es (*Fraxinus excelsior*) door middel van stek.

Voortgang

Tijdens fase 1 is de stekproef die in 2022 is ingezet opnieuw beoordeeld. In het groeiseizoen van 2023 waren er in totaal 180 levende stekken, waarvan 156 stekken met callusweefsel. Er zijn duidelijke verschillen in overleving tussen genotypen waargenomen, variërend tussen 0 en 60% overleving. Daarnaast was de overleving hoger voor de stekken in het zandsubstraat. Wortelgroei was enkel aanwezig in de stekken genomen van jonge zaailingen. De levende stekken zijn teruggeplaatst in de koude kas en vele hebben aan het eind van het groeiseizoen nieuwe knoppen gevormd. Voor de nieuwe stekproef (fase 2) zijn in augustus 2023 tolerante essen geoculeerd. Daarnaast is de klimaatkas/mistkamer van Unifarm gereserveerd (fase 2) voor de nieuwe proef in 2024.

Financiële verantwoording:

Het budget van 2023 is volledig benut.

Geschatte datum afronding:

Eind 2024.

Knelpunten:

n.v.t.

Conclusie

Wordt geformuleerd bij de eindrapportage als de slaging is vastgesteld.